

MARBURG

1968

Untersuchungen zum Nachweis  
von Abort- und Geburtsblut in Blutflecken  
mittels des immunologischen Schwangerschaftstests

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Volker Haag

aus Teplitz-Schönau

Marburg 1968



Untersuchungen zum Nachweis  
von Abort- und Geburtsblut in Blutflecken  
mittels des immunologischen Schwangerschaftstests

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

**Volker Haag**

aus Teplitz-Schönau

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Marburg am 29. 1. 1968  
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert  
Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer  
Correferent: Doz. Dr. med. P. Pots

## Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153305\\_0050](https://archive.org/details/IA40153305_0050)

## Inhalt

|                                                                    | Seite |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| A. <u>Gebräuchliche Schwangerschaftsnachweise an Urin und Blut</u> | .4    |
| 1. Chemie und Physiologie der Gonadotropine . . . . .              | 4     |
| 2. Früher angegebene Verfahren . . . . .                           | .6    |
| 3. Das immunologische Nachweisverfahren. . . . .                   | .8    |
| B. <u>Nachweis in Blutflecken</u> . . . . .                        | .11   |
| 1. Ältere Methoden . . . . .                                       | 11    |
| 2. Methodik des Gonadotropin-Nachweises. . . . .                   | 14    |
| a) Angaben von ABELLI und Mitarbeitern. . . . .                    | 14    |
| b) Eigene Versuche . . . . .                                       | .15   |
| I. Vorversuche und Fehlerquellen. . . . .                          | .15   |
| II. Hauptversuche und Verfahrenstechnik. . . . .                   | .17   |
| III. Ergebnisse und Besprechung . . . . .                          | .22   |
| C. <u>Optimale Verfahrensvorschrift</u> . . . . .                  | .26   |
| 1. Glassachen . . . . .                                            | .26   |
| 2. Reagentien . . . . .                                            | .26   |
| 3. Versuchsgang . . . . .                                          | .27   |
| D. <u>Zusammenfassung</u> . . . . .                                | .28   |
| E. <u>Literatur</u> . . . . .                                      | .30   |

A. Gebräuchliche Schwangerschaftsnachweise  
an Urin und Blut

1. Chemie und Physiologie der Gonadotropine

Gonadotropine sind höhermolekulare Wirkstoffe von Glykoproteidcharakter, die bei der Frau physiologisch in der Hypophyse und in der Placenta gebildet werden. Sie regulieren und stimulieren das Wachstum und die Funktion der Gonaden. Im weiblichen Organismus kommen den 3 hypophysären Gonadotropinen hauptsächlich folgende Aufgaben zu :

Das „follikelstimulierende Hormon“ (FSH) regt das Follikelwachstum an, das „interstitielle Zellen stimulierende Hormon“ (ICSH) fördert die präovulatorische Reifung des Follikels, die Ovulation, die Bildung des Corpus Luteum und dessen Östrogen- und Progesteronproduktion, das „luteotrope Hormon“ (LTH) bewirkt u.a. die Aufrechterhaltung der Funktion der Brustdrüse und zusammen mit dem ICSH die Sekretion des Corpus luteum.

Sofort nach der Implantation des Eies wird in der Placenta das menschliche Choriongonadotropin (HCG) in großen Mengen gebildet, das vorwiegend Eigenschaften des ICSH hat. Es ist das eigentliche Schwangerschaftshormon, das hauptsächlich während der ersten 3-4 Monate der Schwangerschaft von den Chorionzotten gebildet wird und zum größten Teil wieder verschwindet,

wenn von der Placenta genügend Progesteron gebildet wird. Das HCG kann im Serum nachgewiesen werden und wird auch im Urin, besonders stark während der ersten Schwangerschaftsmonate, ausgeschieden (Abb.1)

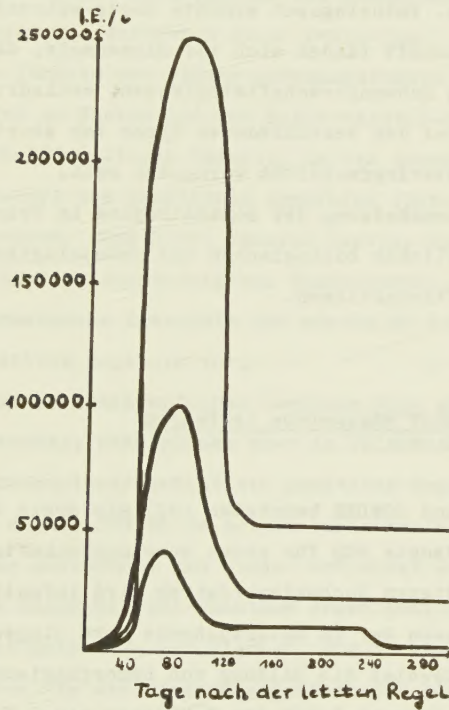


Abb.1. HCG-Ausscheidung bei normaler Schwangerschaft (Streu- und Mittelwerte nach LOEWIT und PHILADELPHY)

Der Abbildung liegen die Mittelwerte und Streubreiten von normalen Schwangerschaften in I.E./l Urin zugrunde. 1 I.E. entspricht einer bestimmten Menge eines internationalen Referenz-Präparats aus HCG, benutzt als Bezugssubstanz zur Bestimmung von Choriongonadotropinen. Pathologisch erhöhte Werte während der Schwangerschaft finden sich bei Blasenmole, Chorionepitheliom und Schwangerschaftstoxikosen, erniedrigte Werte sollen bei den verschiedenen Typen von Aborten und bei Extrauterin gravidität vorhanden sein.

Auf der Ausscheidung der Gonadotropine im Urin beruhen die üblichen biologischen und immunologischen Schwangerschaftsreaktionen.

## 2. Früher angegebene verfahren

ASCHHEIM und ZONDEK benutzten 1927 als erste das von ihnen entdeckte HCG für einen Schwangerschaftsnachweis. In diesem Nachweisverfahren wird infantilen weiblichen Mäusen der zu untersuchende Harn eingespritzt. Nach 5 Tagen beweist die Bildung von hämorrhagischen Follikeln und Corpora lutea das Vorliegen einer Schwangerschaft.

Den gleichen Nachweis erbringt die FRIEDMANN'sche Reaktion an virginellen Kaninchen in 48 Stunden (1931).

Bei der KUPPERMANN-Reaktion (1943) erkennt man schon 2 Stunden nach intraperitonealer Injektion des zu prüfenden Harns eine Ovarhyperämie bei unreifen weiblichen Ratten.

Der HOGBEN-Test benutzt als Versuchstier die Kröte *Xenopus laevis*. Die Injektion des Harns bewirkt nach 24 Stunden das Auftreten einer Ovulation.

Das jüngste und bisher gebräuchlichste Nachweisverfahren an Tieren ist der GALLI-MAININI-Test. Injektion von HCG-haltigem Material in den dorsalen Lymphsack bewirkt bei männlichen Amphibien (*Bufo arëanus*, *Bufo merinus*, *Bufo bufo*, *Xenopus laevis*, *Rana pipiens*) nach 2 Stunden Ausstoßung von Spermatozoen. Bei Fehlen der Spermatozoen innerhalb der ersten 24 Stunden liegt ein negatives Ergebnis vor.

Diese Nachweisverfahren benutzen Urin als Injektionsmaterial. BERG konnte aber im FRIEDMANN-Test mit 2-3 ml Retroplazentarblut ein positives Ergebnis erzielen, ebenso ZONDEK in seinem Verfahren mit Leichenblut, das getrocknet und wieder aufgelöst worden war. Auch die GALLI-MAININI-Reaktion ergab positive Ergebnisse mit Extrakten von Flecken, die Schwangerenserum enthielten. Es wird jedoch gegenüber der Routinemethode die doppelte Menge an getrocknetem Serum benötigt (nach PASETTO u.Mitarb.).

### 3. Das immunologische Nachweisverfahren

Das 1960 von WIDE und GEMZELL beschriebene immunologische Nachweisverfahren beruht auf der antigenen Eigenschaft von Proteohormonen, die die Bildung von Antikörpern induziert. Es handelt sich also um eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die in diesem Falle auf der Hemmung der Hämagglutination HCG-beladener Erythrozyten in Gegenwart von HCG-Antiserum beruht. Das Antiserum wird von Kaninchen gewonnen, die vorher mit HCG immunisiert worden waren. Hammelerythrozyten dienen als Träger für das Antigen. Sie lassen sich durch Behandlung mit Formaldehyd stabilisieren und durch Gerbsäure so vorbereiten, daß menschliches Choriongonadotropin adsorbiert werden kann.

Werden dem Antiserum Nichtschwangerenurin und anschließend mit HCG beladene Erythrozyten zugefügt, so kommt es zur Hämagglutination. Diese wird verhindert, wenn man Schwangerenurin nimmt, der sofort mit dem Antigen reagiert und es bindet. Die sensibilisierten Erythrozyten finden dann wegen der schon abgelaufenen Antigen-Antikörper-Reaktion ein immunologisch neutrales Milieu vor. Sie bilden einen typischen braunen Sedimentationsring am Boden des Teströhrchens, im Gegensatz zur Agglutination der Erythrozyten mit Sedimentationshemmung und diffusem, gelblichem Bodensatz (Abb.2).

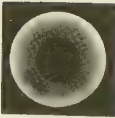


Abb.2a. Positives Ergebnis mit Sedimentationsring

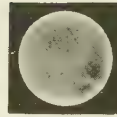
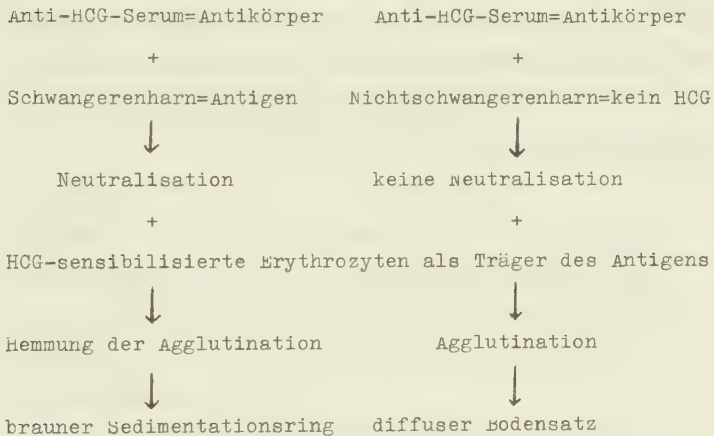


Abb.2b. Negatives Ergebnis mit diffusem Bodensatz

Das folgende Schema soll diesen Vorgang, hier am Beispiel des „Pregnosticon“-Tests (ORGANON), verdeutlichen.



Der „Pregnosticon“-Test wird geliefert mit gefriergetrockneten Erythrozyten und in gleicher Form zubereitetem Antiserum in Einzelampullen, die gleichzeitig als Reagensglas dienen. Hinzu kommen Lösungsmittel für

die Erythrozyten und ein Ampullenhalter mit eingebautem Spiegel zum besseren Ablesen des Ergebnisses.

Die Empfindlichkeit der Reaktion liegt nach Firmenangabe bei 1000 I.E./l. Positiver Ausfall findet sich bereits 8 Tage nach Ausfall der Menstruation. In der Literatur schwanken die Angaben über die Zuverlässigkeit zwischen 92 und 99%; der Durchschnitt liegt bei 98% und ist anderen Nachweismethoden ebenbürtig, wenn nicht überlegen. Weitere auf dem immunologischen Prinzip beruhende Reaktionsansätze sind im Handel („ORTHO“, „PREPUERIN“, „GRAVINDEX“). Die Vorteile der immunologischen Schwangerschaftsnachweise gegenüber der Tierhaltung mit ihrem zeitlichen und materiellen Aufwand liegen in der größeren Genauigkeit und den standardisierten Versuchsbedingungen.

## B. Nachweis in Blutflecken

### 1. Ältere Methoden

Für die gerichtlich-medizinische Untersuchung, z.B. bei Verdacht auf Kindestötung oder Schwangerschaftsunterbrechung, ist oft eine Unterscheidung zwischen Geburts- oder Abortblutflecken und Blutflecken anderer Herkunft von Bedeutung. So gab es Versuche, durch mikroskopische Untersuchungen oder Bestimmung von bestimmten Fermenten und Blutbestandteilen, die während der Schwangerschaft von der Norm abweichen sollen, Abort- oder Geburtsblut in Flecken nachzuweisen. Sie erwiesen sich aber größtenteils als unzureichend für die Erfordernisse eines gerichtsmedizinischen Laboratoriums.

Eine mikroskopische Untersuchung dient dem Nachweis von Chorionzellen und Fruchtwasserbestandteilen, wie Oberhautschuppen, Hautschmiere oder Lanugohaaren, die aber erst in der 2. Hälfte der Schwangerschaft gefunden werden.

Nach KEIDERLING und SEGGSCHNEIDER ist der Kupfergehalt im Schwangerenblut erhöht. THOMA und KUCHINKE haben auf dieser Grundlage ein kompliziertes Verfahren für die Blutfleckendiagnostik angegeben. Die Methodik konnte jedoch in einer eingehenden Untersuchung durch HARTWIG nicht verifiziert werden.

Eine Zunahme des Histaminasegehalts (Diaminoxidase) im mütterlichen Blut mit zunehmender Schwangerschaftsdauer, die durch die Intensität des Histamin-Abbaues, verursacht durch den Fermentgehalt des Blutes, im Vergleich zu einer Histamin-Standard-Lösung ohne Fermentzusatz gekennzeichnet ist, wurde von WERLE und EFFKE-MANN beschrieben. BERG wandte dieses Verfahren erfolgreich an Blutfleckenextrakten an. Die Befunde konnten jedoch von SCHLEYER und GREFERATH nicht reproduziert werden.

Auf der Wirkung der Gonadotropine beruhen weitere, zum Teil schon beschriebene Verfahren. BERG bewies mit dem FRIEDMANN-Test den erhöhten Gonadotropinspiegel in Geburtsblut. Für eine positive Reaktion genügen 2-3 ml, minimal 1,5 ml Retroplazentarblut in einem Blutfleck, der einige Stunden mit Tyrodelösung extrahiert wird. Dieser Extrakt wird filtriert und in die Ohrvene eines virginellen Kaninchens injiziert. Mit Abortblutflecken erhielt er unsichere Ergebnisse, die er vom Schwangerschaftsmonat, vom Zeitpunkt der Blutung vor oder nach Ausstoßung der Frucht und von der Lagerungszeit des Fleckens abhängig macht. Ein Extrakt eines 3 Tage alten, 10 ml Blut enthaltenden Fleckens vom 5. Monat ergab ein positives Ergebnis, während er in einem anderen Fall von Abort im 4. Monat an einem 3 Monate alten, 2,75 ml enthaltenden Flecken ein negatives Ergebnis hatte. Beweiskräftig, aber nicht obligat sind nur positive Ergebnisse.

Auch für die GALLI-MAININI-Reaktion ist ein positiver Ausfall an Extrakten von Flecken, die Schwangerenserum enthielten, beschrieben. BLIZNAKOV und AVRAMOVA trockneten sofort nach vollendetem Abort uterines Blut von 33 Frauen auf Karton, Porzellan und Baumwollgewebe im Freien, im Schatten, in der Sonne und bei Raumtemperatur. Alle 5-6 Tage extrahierten sie aus 20-200 mg Trockensubstanz in 1 ml „Serumlösung“ (pH 7,2; 1:30) 2 Stunden lang bei 37°. Nach 48-stündiger Trocknungs- und Lagerungszeit ergab die Injektion in allen Fällen positive Ergebnisse, bei 89% der Versuche schon mit 20 mg Trockensubstanz; für den Rest wurden 30-100 mg benötigt. In 61% der Fälle konnten noch nach 100 Tagen, in 2 Fällen sogar nach 200 Tagen positive Resultate erzielt werden. Bei den im Sonnenlicht aufbewahrten Flecken wurde der Versuch schon nach 40-70 Tagen negativ.

## 2. Methodik des Gonadotropinnachweises

Zur Anwendung des immunologischen Verfahrens, das normalerweise Urin benötigt, an Blutflecken muß in einem komplizierten und zeitraubenden Verfahren ein Extrakt gewonnen werden, in dem die Gonadotropine unverändert enthalten sind.

### a) Angaben von ABELLI und Mitarbeitern

ABELLI und Mitarb. haben folgendes Verfahren entwickelt:

Der Blutflecken wird aufgefaserst und 12 Stunden bei 4°C in destilliertem Wasser belassen. Anschließend werden die größeren Fasern abfiltriert.

Das Filtrat wird zwecks Fällung der Proteine und damit auch der Gonadotropine mit der doppelten Menge Azeton versetzt. Dieser Ansatz wird bei 4°C aufbewahrt.

Nach 4 Stunden wird der Überstand abgegossen, das Präzipitat 10 min bei 3800 U/min zentrifugiert, erneut der Überstand verworfen und der Bodensatz mit 50% Alkohol versetzt. Hierauf wird erneut zentrifugiert.

Dieser Vorgang wird mit 85% und 95% Alkohol und mit Äther - immer im Verhältnis 1:2 - wiederholt.

Das so erhaltene Präzipitat wird im Vacuum getrocknet und mit wenig Sörensen-Puffer (pH 6,4) aufgelöst. Dieser Ansatz wird für 2 Stunden bei 4°C belassen.

Nach 10 min Zentrifugieren bei 4000 U/min wird der Überstand für den immunologischen Test verwendet.

ABELLI benutzte den „ITG-Serotest“ des Istituto Farmacologico Sero, der heute nicht mehr im Handel ist. Die Extrakte stellte er aus Vorlagen von Frauen her, die einen Abort hatten. Sie wurden bei 4°C, bei Raumtemperatur und bei 60°C gelagert. Die Versuche erbrachten folgende Ergebnisse:

Alle bei 60°C aufbewahrten Flecken verloren schon nach 5 Tagen ihre immunologische Aktivität. Die bei Raumtemperatur gelagerten Flecken ergaben im Durchschnitt noch positive Ergebnisse nach 8 Tagen mit einer Streuung von 6-10 Tagen. Die bei 4°C aufbewahrten Flecken hatten ein positives Ergebnis im Durchschnitt von 13-15 Tagen und einem Maximum von 18 Tagen.

#### b) Eigene Versuche

##### I. Vorversuche und Fehlerquellen

Zum Einarbeiten in die Methodik wurden Vorversuche mit Urin, Serum und mit Blutflecken (Venen-, Geburts- und Abortblut) unternommen, die von Schwangeren und von Nichtschwangeren aus verschiedenen Zyklusphasen stammten. Sie erbrachten, bedingt durch mangelnde Übung und Fehlerquellen, zu Beginn schlechte, später befriedigende Ergebnisse. Der anfangs benutzte italienische

"ITG-Serotest" zeigte sich bei vergleichenden Urinproben schwangerer und nichtschwangerer Frauen dem "Pregnosticon"-Test unterlegen. Zur Vermeidung von Fehlern muß folgendes beachtet werden:

a) Glassachen müssen völlig frei von Detergentien, also Seifen, Reinigungsmitteln usw. und sollen mit Chromsäurelösung und destilliertem Wasser gut gereinigt sein. Auf Sauberkeit von Reinigungsbürsten für Reagentgläser ist zu achten!

b) Es müssen Eichpipetten verwendet werden.

c) Der Ampullenhalter muß erschütterungsfrei aufgestellt werden. Nähe von Zentrifugen ist zu vermeiden, ebenso direktes Sonnenlicht oder Heizkörper.

d) Das Testmaterial ist im Kühlschrank aufzubewahren.

e) Die zweistündige Ablesezeit des Ergebnisses ist genau einzuhalten, da nach dieser Zeit noch Sedimentbildungen auftreten können. Es dürfen aus diesen keine Schlüsse gezogen werden, sie können lediglich darauf hinweisen, daß die HCG-Menge an der Grenze der Nachweismöglichkeit liegt.

f) Außer den pathologischen Erhöhungen des Gonadotropinspiegels können auch in der Menopause Werte vorliegen, die schon an die Empfindlichkeitsgrenze des Urintests heranreichen. Es empfiehlt sich in solchen Fällen, den Urin mit der gleichen Menge destillierten Wassers zu verdünnen und dann den Versuch vorschriftsmäßig ablaufen zu lassen. Nach LOEWIT sollen in seltenen

Fällen falschpositive Ergebnisse auch auftreten bei Hypophysentumoren, durch Wegfall der Hypophysenbrem-  
sung bei Ovarialinsuffizienz, plötzlichem Entzug hor-  
monaler Substitution, Seminomen und anderen Hoden-  
tumoren (positiver Test bei Männern), gynäkologischen  
Krankheiten wie entzündlichen Adnextumoren und Genital-  
karzinomen, ebenso bei Blutspuren im Urin und massiver  
Proteinurie.

g) Eine weitere Fehlerquelle, die sich aus der  
Reihenfolge in der Versuchsanordnung ergab, wird im  
Anschluß an den Abschnitt „Hauptversuche und Verfahrens-  
technik“ beschrieben.

## II. Hauptversuche und verfahrenstechnik

Für die Vor- und Hauptversuche wurden Flecken be-  
nutzt, die im Kreißsaal durch Unterlegen eines Tuches  
während der Geburt oder durch Tränken mit frischem  
Geburtsblut hergestellt worden waren. Die Abortblut-  
flecken stammen aus vorlagen von Frauen, die - meist  
im 2.-4. Monat - während eines Aborts oder einer Abrasio  
geblutet hatten.<sup>4)</sup>

Die so erhaltenen Blutflecken wurden zur Hälfte  
im Kühlschrank bei +4°C, zur Hälfte bei Raumtemperatur  
aufbewahrt. An diesen Blutflecken sollte untersucht  
werden, ob ein Schwangerschaftsnachweis möglich sei,

---

<sup>4)</sup> An dieser Stelle danke ich Herrn Prof.Dr.R.Buchholz,  
Direktor der Universitäts-Frauenklinik Marburg, für die  
freundliche Erlaubnis, mir Blutfleckenmaterial aus der  
Klinik beschaffen zu dürfen.

und wie lange die Gonadotropine ihre immunologische Aktivität behielten.

Es wurde folgende Verfahrenstechnik angewandt, die im Prinzip der Methodik ABELLIs entspricht, aber späteren Untersuchern durch genauere Größen- und Maßangaben das Einarbeiten in die Methode erleichtern soll.

a) Der Blutfleck wird in kleine Teilchen zerschnitten und in einer Färbeküvette für Objektträger 12 Stunden lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  in destilliertem Wasser gelöst. Dabei sollen alle Stoffteilchen gut von Wasser bedeckt sein. Die Mindestgröße der Flecken, mit der noch gearbeitet werden kann, liegt nach den in den Versuchen gewonnenen Erfahrungen wegen der besonders bei alten Flecken geringen Menge an Präzipitat bei etwa  $50\text{ cm}^2$  Fläche.

b) Die Fasern und Stoffteilchen werden abfiltriert.

c) Die Proteine werden in 50 ml Zentrifugengläsern durch Zusatz der doppelten bis dreifachen Menge Azeton gefällt. Um dieses Verhältnis zu wahren, und um dauerndes Umgießen von großen in kleine Glasgefäße zu vermeiden (Substanzverlust!), verteilt man die Extraktmenge eines Versuchs vorher auf 2 Gläser. So ergibt sich bei einer Fleckengröße von etwa  $50\text{-}150\text{ cm}^2$  im Durchschnitt ein Volumen von etwa 15-20 ml/Glas. Dieses wird dann mit Azeton auf 45-50 ml aufgefüllt und kräftig durchge-

schüttelt. Dieser Ansatz wird für 2-3 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt; es hat jedoch keinen Einfluß auf das Ergebnis, wenn diese Zeit etwas unter- oder überschritten wird.

d) Dann wird der Überstand vorsichtig abgesaugt, soweit das ohne größeren Substanzverlust möglich ist, und der Rest 10 min bei etwa 3800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, der Bodensatz mit der doppelten bis dreifachen Menge 50% Alkohols verrührt. Hierauf wird erneut zentrifugiert.

e) Dieser Vorgang wird mit 95% Alkohol und Äther wiederholt. Das Auswaschen dient vorwiegend der Entfernung störender Östrogene und anderer Steroide. Alle Überstände werden verworfen.

f) Das so erhaltene Präzipitat wird an der Luft getrocknet, bis der Äther vollkommen entwichen ist. Dies ist nach 2-3 Stunden der Fall.

g) Die Inhalte beider Zentrifugengläser werden nun vereinigt, mit einem dicken Glasstab pulverisiert und in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt.

h) Dieses pulverisierte Präzipitat wird mit Sörensen-Puffer vom pH 6,4 versetzt. Es ist darauf zu achten, daß nur soviel Puffer zugegeben wird, daß das pulverisierte Präzipitat gerade in Lösung ist, und beim Ver-  
rühren ein dünnflüssiger Brei entsteht. Es kann dabei mit solch geringen Puffermengen gearbeitet werden,

das nach dem später folgenden Aufsaugen (Absatz 1) nur noch Bodensatz übrigbleibt. Dies entspricht dann der maximal zu erzielenden Gonadotropinkonzentration in der abgesaugten Flüssigkeit. Der Puffer wird hergestellt, indem man 2,67 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Lösung A) und 2,041 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lösung B) in je 100 ml destilliertem Wasser auflöst. Den pH 6,4 erreicht man durch Mischen von 3,8 ml der Lösung A mit 6,2 ml der Lösung B. Der Ansatz wird für 1-2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

i) Bevor dann 10 min lang bei 4000 U/min zentrifugiert wird, ist nochmals gut umzurühren, und sind Reste der breiigen Substanz mit dem Glasstab von der Wand des Reagensglases herunterzustreichen. So entsteht ein gerader Flüssigkeitsspiegel, der das spätere Aufsaugen des geringen Überstandes sehr erleichtert.

k) Während des Zentrifugierens werden die Ampullen des „Pregnosticon“-Tests geöffnet und die getrockneten Erythrozyten mit Lösungsmittel aufgelöst. Die Testkombination enthält in einer Ampulle das Antiserum als weiße Trockensubstanz, weiterhin ein Glasfläschchen mit gefriergetrockneten Erythrozyten und eine Ampulle mit Lösungsmittel.

l) Mit einer 0,1 ml Pipette werden genau 0,1 ml der überstehenden Flüssigkeit vorsichtig aufgesaugt. Diese Flüssigkeit wird in die Ampulle mit gefriergetrocknetem Antiserum pipettiert (Ausblasen bei Auslaufpipetten!).

m) Unmittelbar danach werden 0,4 ml der homogenisierten Erythrozytensuspension hinzugefügt. Der Ampullenhalter wird 1 Minute geschüttelt und erschütterungsfrei abgestellt. Er darf während der nächsten 2 Stunden bis zum Ablesen des Ergebnisses nicht bewegt werden.

Nachdem während der Vorversuche an Schwangerenblutflecken negative Ergebnisse aufgetreten waren, wurde ein entscheidender Fehler in der Umkehr des ersten Zentrifugievorganges gefunden. Zunächst war nach Ausfällen der Proteine durch Azeton sofort zentrifugiert worden, um für das Absaugen eine klare Trennung von Bodensatz und Überstand zu erhalten. Erst als später der Überstand vor dem ersten Zentrifugieren abgesaugt wurde, ergaben sich befriedigende Ergebnisse. Wahrscheinlich sind es im Lappen vorhandene Waschmittelreste, die vom Azeton nicht ausgefällt werden, so beim Zentrifugieren in das Präzipitat gelangen und das Ergebnis verfälschen.

### III. Ergebnisse und Besprechung

#### a) Geburtsblut

Es wurden nach einigen Vorversuchen 6 Geburtsblutflecken vom Tage der Entbindung an in regelmäßigen Abständen untersucht. Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Flecken zeigten sich bis zum 15. Tag positive Reaktionen. Frühestens nach 15, spätestens nach 33 Tagen wurden die Ergebnisse negativ, der Mittelwert lag bei 23 Tagen. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank wurde das erste negative Ergebnis am 24. Tag, das letzte nach 55 Tagen erhalten; der Mittelwert lag hier bei 32 Tagen (Tab.I und Abb.3).

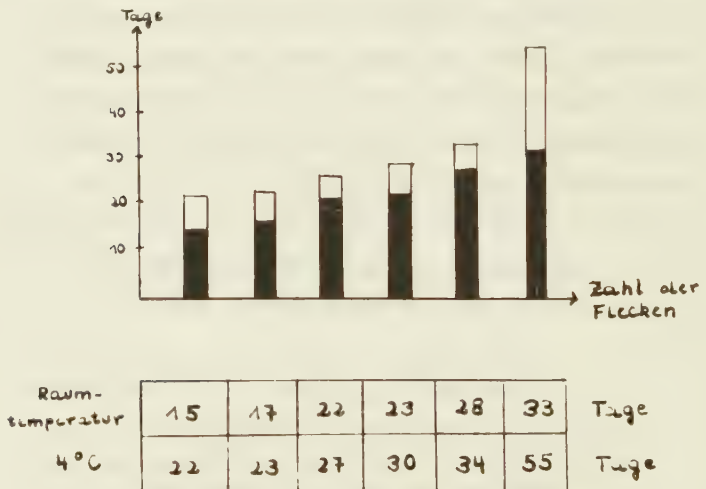


Abb.3 und Tab.I. Positive Ergebnisse nach Lagerung von Geburtsblutflecken bei Raumtemperatur (schwarze Säulen) und bei 4°C im Kühlschrank (weiße Säulen)

Die große Streuung der Ergebnisse ist dadurch bedingt, daß der Gonadotropinspiegel am Ende der Schwangerschaft individuell verschieden sein kann. Außerdem gleicht kein Flecken dem anderen an Serum- und damit Gonadotropingehalt. Dies wiederum und das Alter der Flecken haben unterschiedliche Ausbeute an Präzipitat und damit zu dessen Lösung unterschiedliche Puffermengen zur Folge. Für einen Rückschluss auf den Geburtszeitpunkt ist das Verfahren daher nicht geeignet. Es läßt sich bei positivem Ergebnis lediglich sagen, daß bei der Blutung eine Schwangerschaft vor-  
gelegen hat. Nachträgliche Konservierung eines aufgefundenen Fleckens oder eines Teils von ihm über einen Zeitraum von 33 Tagen hinaus (Tab.I) und erneute Untersuchung mit positivem Ergebnis schließen eine normale Geburt aus. Kontrollversuche mit Menopausenblut und Venenblutflecken, die während verschiedener Zeitpunkte des Zyklus gewonnen wurden, ergaben eindeutig negative Ergebnisse. Unter Umständen müssen die schon zitierten Ursachen falsch-positiver Resultate nach LOEWIT (S.16) ausgeschlossen werden.

b) Abortblut

Es wurden Flecken von verschiedenen Abortarten, meistens von Aborten des 2.-4. Monats untersucht, die ohne Ausnahme noch nach 7-8 Monaten Konservierung eindeutig positive Ergebnisse erbrachten. Da die aus dem Extrakt gewonnene Menge an Trockensubstanz mit fortschreitender Lagerung immer kleiner wurde, wurde das Verfahren nach 9 Monaten dadurch begrenzt, daß nur unter 1 mg Trockensubstanz aus etwa 70-100 cm<sup>2</sup> großen Flecken extrahiert werden konnte, eine Menge, die für den Test unzureichend ist. Ein positives Ergebnis noch nach Lagerung bis zu 7-8 Monaten beweist aber, daß eine Schwangerschaft mit stark erhöhtem Gonadotropinspiegel im Serum vorgelegen haben muß. Dieser erhöhte Spiegel findet sich im Normalfall nur im 2. bis 4. Monat der Schwangerschaft, also in der Zeit der größten Abort- und Abtreibungshäufigkeit. Ausnahmen bilden Blasenmole, Chorionepitheliom, auch sollen Schwangerschaftstoxikosen und Zwillingsschwangerschaften erhöhte Werte zeigen (s.o.). Nach LOEWIT und PHILADELPHY verringert sich der Hormonspiegel bei den verschiedenen Aborttypen gegenüber der normalen Schwangerschaft, er übertrifft aber, wie die Versuche gezeigt haben, den Hormonspiegel zum Zeitpunkt der Geburt bei weitem. Dies wird von CARELLA und Mitarb. bestätigt, die das Serum von Frauen im Puerperium post partum und post abortum untersuchten. Sie stellten fest,

daß am 1. Tag nach der Geburt ein Gonadotropinspiegel von etwa 10000 E/l, am 1. Tag nach dem Abort dagegen von 32000 E/l vorhanden war. Die immunologische Nachweisbarkeit im Serum endete am 12. Tag post partum und am 13. Tag post abortum.

Quantitativ kann mit dem verfahren nicht gearbeitet werden, da selbst bei konstanter Fleckengröße nie der genaue Serumgehalt ermittelt werden kann. Dementsprechend müssen der Gonadotropingehalt, die menge des Präzipitats und der erforderlichen Puffermenge variieren. Die Ausbeute an Trockensubstanz ist vom Alter des Fleckens abhängig. So ergab ein 100 cm<sup>2</sup> großer, frischer Flecken 1500 mg Trockensubstanz; dieser Wert verminderte sich nach nur eintägiger Lagerung auf die Hälfte. Ein 6 Monate alter Abortblutflecken von etwa 80 cm<sup>2</sup> ergab 10 mg, ein 9 Monate alter Flecken von etwa 70 cm<sup>2</sup> nur noch 1 mg Trockensubstanz.

Die für einen Flecken größtmögliche Gonadotropinkonzentration kann erreicht werden, wenn so wenig Puffer hinzugefügt wird, daß nach dem Zentrifugieren gerade noch 0,1 ml über dem Bodensatz aufgesaugt werden können (s.o.).

## C. Optimale Verfahrensvorschrift

### 1. Glassachen

Färbeküvette für Objektträger

2 Zentrifugengläser 50 ml

1 Zentrifugenröhrchen 10 ml

0,1 ml Eichpipette

1 ml Pipette oder 0,4 ml Kunststoffpipette

2 ml Pipette

10 ml Erlenmeyerkolben für Puffer

Glasstäbe

Trichter mit Filterpapier

### 2. Reagentien

„Pregnosticon“-Testmaterial

Azeton

Alkohol 50%, 95%

Äther

Sörensen-Puffer pH 6,4

Aqua dest. und Chromsäurelösung

### 3. Versuchsgang

a) Zerschneiden des zu untersuchenden Fleckens in kleine Stücke. Die Stoffteilchen werden für 12 Stunden in Aqua dest. im Kühlschrank belassen ( $+4^{\circ}\text{C}$ ).

b) Die Stoffteilchen werden abfiltriert, und das Filtrat wird auf zwei 50 ml Zentrifugengläser verteilt.

c) Die Proteine werden mit der doppelten bis dreifachen Menge Azeton ausgefällt. Schütteln und Stehenlassen des Ansatzes für 2-4 Stunden im Kühlschrank.

d) Absaugen des Überstandes; das Präzipitat wird bei 3800 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz mit 50% Alkohol im Verhältnis 1:3 verrührt.

e) Wiederholung des Vorgangs je mit 95% Alkohol und Äther.

f) Trocknen des Präzipitates an der Luft.

g) Die Trockensubstanz beider Gläser wird vereinigt, mit einem Glasstab pulverisiert und in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt.

h) Diese Trockensubstanz wird mit möglichst wenig Sörensen-Puffer von pH 6,4 so gelöst, daß eine breiige Flüssigkeit entsteht. Stehenlassen des Ansatzes für 1-2 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

i) Der Ansatz wird 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert.

k) Öffnung der Ampullen und Auflösung der gefriergetrockneten Erythrozyten mit Lösungsmittel nach Vorschrift.

l) 0,1 ml des Überstandes werden aufgesaugt und in die Ampulle mit gefriergetrocknetem Antiserum pipettiert.

m) Zugabe von 0,4 ml der homogenisierten Erythrozyten-suspension; Schütteln des Ansatzes und erschütterungsfreies Aufstellen bis zum Ablesen des Ergebnisses nach 2 Stunden.

#### D. Zusammenfassung

Im gerichtlich-medizinischen Spurenlaboratorium ist gelegentlich die Herkunft von Blutflecken zu differenzieren. Diese Notwendigkeit ergibt sich dann nicht nur hinsichtlich der Unterscheidung von Blutungen aus dem weiblichen Genitale und anderen Blutflecken, sondern auch von Abort- und Geburtsblut.

Nach dem vorschlag italienischer Autoren (1964) wurde die Methodik des immunologischen Gonadotropinnachweises an Blutflecken erprobt. Es wurde mit der Testkombination „Pregnosticon“ gearbeitet. Extrakte von Geburtsblutflecken wurden bei Raumtemperatur frühestens nach 15 Tagen, spätestens nach 33 Tagen negativ, bei Konservierung bei 4°C nach 24 und 55 Tagen. Extrakte von Abortblutflecken aus dem 2. bis 4. Monat ergaben 7-8 Monate lang positive Ergebnisse. Nach 9 Monaten konnte wegen zu geringer Ausbeute an Trockensubstanz nicht mehr untersucht werden.

Die Angaben der Literatur zur Methodik der Blutfleckenuntersuchung wurden insofern abgewandelt und verbessert, als die zum Teil vagen und unklaren Angaben durch die eigenen Versuche präzisiert werden konnten. Eine optimale Technik wurde ausgearbeitet.

Für gerichtlich-medizinische Zwecke sind nur positive Ergebnisse zu verwerten, negative besagen lediglich, daß während der letzten 15 Tage vor der Blutung

keine Geburt und während der letzten 7-8 Monate kein Abort stattgefunden hatte, d.h. daß die Blutflecken anderer Herkunft sein müssen. Eine normale Geburtsblutung am Schwangerschaftsende läßt sich durch nachträgliche Lagerung des Fleckens über einen Zeitraum von 33 Tagen hinaus und ein positives Untersuchungsergebnis ausschließen. Ein positives Ergebnis noch nach dieser Zeit beweist einen Zustand während der Blutung, der mit stark erhöhtem Gonadotropinspiegel einhergegangen ist. Für quantitative Untersuchungen ist die Methode wegen der unterschiedlichen Fleckengröße, dem wechselnden Serumgehalt im alternden Blutflecken und damit wechselndem Gonadotropinspiegel mit wechselnder Menge an Präzipitat und notwendigem Pufferzusatz nicht geeignet.

E. Literatur

1. ABELLI, G., B. VITERBO and M. PALAGARIO: The Immunological Diagnosis of Pregnancy with Specimen of Bloodstains. Med., Sci., Law 4, 115, 1964
2. APOSTOLAKIS, M. und K. VOGT: Gonadotropine. Stuttgart, Thieme, 1965
3. BERG, S.: Der Nachweis von Geburts- und Abortblut bei der Untersuchung von Spuren. Gerichtl. Med. 39, 193, 1948/49
4. BLIZNAKOV, C. et P. AVRAMOVA: Constatacion de la Grossesse au Moyen des Taches de Sang. Arch. Un. Med. Balkan. 1, 641, 1963, ref. z. gerichtl. Med.
5. CARELLA, A., P. FUCCI e A. CHINI: La Reazione Sieroimmunologica di Gravidanza nelle sue Applicazioni medico-legali. Zacchia 38, 313, 1963
6. HARTWIG, K.: Kritische Untersuchungen über den Nachweis von Geburtsblut in Flecken mittels Bestimmung des Kupfergehalts. Diss. Bonn 1961
7. KEIDERLING, W.: Über die Kupferproteinverbindung in Blutplasma. Klin. Wschr. 28, 460, 1950
8. LOEWIT, K. und V. PHILADELPHY: Quantitative Choriongonadotropinbestimmung mit einem immunologischen Schwangerschaftstest. Wien. med. Wschr. 1965, 107
9. LOEWIT, K.: Die immunologischen Schwangerschaftstests. Dtsch. med. Wschr. 1966, 1609
10. PASETTO, N., P. DONINI, G. MONTANINI and F. STUCCHI: A New Immunological Pregnancy Test. Panminerva Med. 6, 199, 1964

11. SCHLEYER, F. und C. GREFERATH: Versuche über den Nachweis von Geburtsblut mittels der Diaminoxidasereaktion. z. gerichtl. Med. 45, 62, 1956 - Bemerkung zur Technik der Diaminoxidasereaktion in Serum. z. gerichtl. Med. 45, 252, 1956
12. THOMA, K. und K. KUCHINKE: Ein neuartiger Nachweis von Abortus- und Geburtsblutspuren. Arch. Kriminol. 115, 61, 1955
13. WERLE, E. und G. EFFKEMANN: Schnellmethode zur Schwangerschaftsbestimmung. Klin. Wschr. 1940, 717
14. WIDE, L.: An Immunological Method for the Assay of Human Chorionic Gonadotropin. Acta Endocrin. 41, Suppl. 70, 1962
15. WIDE, L. and C. GEMZELL: An Immunological Pregnancy Test. Acta Endocrin. 35, 261, 1960

Herrn Professor Dr. Schleyer danke ich für die  
Überlassung des Themas und seine Beratung bei den  
Versuchen und der Ausarbeitung der Dissertation.

## Lebenslauf

Am 23. 11. 1940 wurde ich als zweiter Sohn des damaligen Regierungsrats, jetzigen Finanzgerichtsdirektors i.R. Dr. Karl Haag und seiner Ehefrau Margarethe geb. Winter in Teplitz-Schönau geboren. Wie meine Eltern bin ich evangelisch. Ein Jahr nach meiner Geburt zogen wir nach Berlin, wurden aber 1943 nach Schlitz in Oberhessen evakuiert. Dort besuchte ich vom Herbst 1946 bis Ostern 1951 die Volksschule und anschließend die Sexta des Realgymnasiums. 1952 zogen wir nach Kassel. Meine Ausbildung setzte ich an der heutigen Albert-Schweitzer-Schule fort, an der ich im Frühjahr 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend leistete ich bis zum Jahresende 1961 einen auf 21 Monate verlängerten Wehrdienst bei der Bundeswehr ab, die ich als Reserveoffizier verließ.

Im Januar 1962 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg mit dem Medizinstudium, in dessen Verlauf ich im März 1963 das Vorphysikum und im Oktober 1964 das Physikum bestand. Das Wintersemester 1964/65 verbrachte ich in Innsbruck, das Sommersemester 1965 in Kiel und die folgenden Semester bis zum medizinischen Staatsexamen wieder in Marburg. Das Staatsexamen beendete ich am 5. 1. 1968.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren  
Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Berendes, Bommer, Buchholz, Braun-Falco, Bücher, Brück,  
Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, du Mesnil de Roche-  
mont, Exner, Hamm, Hensel, Hildebrandt, Hohorst, Jacob,  
Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Martini,  
Mattes, Marx, Neubauer, Niessing, Peters, Petry, Petzold,  
Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmidt, Schmid, Schrappe,  
Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Staib, Straub,  
Streicher, Strohmeier, Walcher, Wendt, Amon, Gedigk,  
Beckmann, Hardewig

in Innsbruck:

Baumgartner, Berger, Braunsteiner, Günther, Halhuber,  
Huber, Konrad, Lang, Tapfer

in Kiel:

Brunck, Caesar, Gärtner, Knothe, Merkel, Overbeck,  
Spreter von Kreudenstein







